

学校编码: 10384

分类号____密级

学号: 24520100154083

UDC

厦门大学

博士学位论文

**Wnt/ β -catenin 信号通路在近视发生发展中的
作用**

**The role of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in the
development of myopia**

刘 真

指导教师姓名：刘祖国 教授

专 业 名 称：生理学

论文提交日期：2015 年 5 月

论文答辩时间：2015 年 5 月

学位授予日期：2015 年 月

答辩委员会主席：

评 阅 人：

2015 年 月

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题
(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

☐ 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

☐ 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

近视是一种常见的屈光不正。高度近视则可能伴随各种严重的并发症，甚至致盲。近视发生发展的机制迄今不清，目前也无法有效的防治。因此，近视发生发展的机制一直是眼科学研究的重要课题之一。本论文通过对近视发生过程中的基础研究，探讨近视发生的机制，以发现新的药物靶点及寻求治疗近视的新途径。

多巴胺 D2 受体 (Dopamine D2 receptors, D2R) 在调控眼球的屈光发育中发挥重要作用，但其具体的作用机制尚不清楚。我们考虑 DA/D2R 可能是通过调控下游的信号通路来发挥作用。在本论文中，我们用小鼠形觉剥夺近视 (FDM) 的动物模型进行研究。结果发现 FDM 处理 4 周后，小鼠视网膜的 Wnt/ β -catenin 信号通路被激活；FDM 处理组同时腹腔注射 D2R 激动剂 quinpirole，Wnt/ β -catenin 通路被进一步激活，且近视程度加重，而 FDM 处理组同时腹腔注射 D2R 拮抗剂 sulpiride，Wnt/ β -catenin 通路的激活被抑制，且近视程度减轻。这些结果表明，Wnt/ β -catenin 信号通路参与 DA/D2R 对 FDM 近视的调控，并和小鼠近视程度具有相关性。为了进一步研究 Wnt/ β -catenin 信号通路在近视中的作用，我们在 FDM 诱导近视的不同时间点检测 Wnt/ β -catenin 信号通路的关键蛋白在视网膜中的变化情况，发现 Wnt/ β -catenin 信号通路在形觉剥夺的早期就被激活，并参与近视的发生发展。在 Wnt/ β -catenin 信号通路被激活 APC^{Min} 小鼠中，出生后屈光也向近视方向发展，巩膜的主要组成成份 I 型胶原代谢紊乱。在预防和治疗实验中，口服 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制剂 niclosamide 可以有效的抑制 FDM 小鼠和 APC^{Min} 小鼠视网膜的 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活，进而抑制近视的发展。在临床上，我们也发现高度近视患者组循环血液中的 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制剂 DKK-1 水平明显低于健康对照组和中度近视组；并且 DKK1 浓度和近视度数具有一定的相关性，表明 Wnt/ β -catenin 信号通路在临床上参与近视的发生发展。

总之，在本论文中，我们首次研究了 Wnt/ β -catenin 信号通路参与 DA/D2R

对小鼠近视的调控，并进一步证实 Wnt/ β -catenin 信号通路在近视过程中发挥重要作用。

关键词：近视 Wnt/ β -catenin 信号通路 多巴胺（DA）/多巴胺受体

厦门大学博硕士论文摘要库

ABSTRACT

Myopia is a common refractive error that can cause a variety of serious complications and blindness. It is important to find the mechanism of myopia development.

Although numerous risk factors have been studied over decades of epidemiological and experimental research, a comprehensive mechanistic framework for refractive error development in humans remains elusive. It is necessary to take further study to understand the pathogenesis of myopia.

Dopamine(DA) and dopamine receptor 2 (D2R) play important roles in the regulation of eye refractive development. But the exact mechanism is largely unknown. In our study, we found that Wnt/ β -catenin signal pathway was changed in the retina of form deprivation myopia(FDM) mice, which regulated by the DA/D2R signal pathway. FDM mice treated with D2R agonist quinpirole can enhance the development of myopia with more activation of Wnt/ β -catenin pathway, whereas FDM mice treated with D2R antagonist sulpiride inhibit myopia with less activation of Wnt/ β -catenin pathway. To evaluate the activation status of the canonical Wnt/ β -catenin pathway in the retina of myopia mice, we have measured retinal levels of total β -catenin after FDM treatment 1, 3, 5, 7, 14 and 28 days and found that Wnt/ β -catenin signal pathway was activated in the early stage of FDM. We also observed a greater myopic shift, increased vitreous chamber depth and rearrangement scleral collagen fibril in APC^{Min} mice, in which Wnt/ β -catenin signaling pathway was activated. Meanwhile, an inhibition of Wnt/ β -catenin signaling pathway with niclosamide administration can attenuate the development of myopia in the FDM mice and APC^{Min} mice. Moreover, we also demonstrated that DKK1, Wnt/ β -catenin signaling pathway secreted inhibitor, was significantly lower in the serum of high myopia patients compared with healthy control group and moderate myopia group. It indicates that Wnt/ β -catenin signaling pathway participate in the development of

myopia in clinical.

In summary, our findings provide evidence that the canonical Wnt/ β -catenin signal pathway regulated by DA/D2R plays an important role in the postnatal refractive development

Key words: myopia; Wnt/ β -catenin signal pathway; DA/D2R

厦门大学博硕士论文摘要库

目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT	III
第一章 前言.....	1
1.1 近视的分类和流行病学研究	1
1.2. 近视研究的动物模型	3
1.2.1 实验动物的选择	3
1.2.2 近视动物模型的诱导方法	4
1.3 近视发病机制的研究现状	5
1.3.1 环境因素水平的研究	5
1.3.2 遗传因素中的基因水平研究	6
1.3.3 与近视发病相关的 信号转导通路研究现状	12
1.3.4 Wnt / β -catenin 信号通路	15
1.3.5 多巴胺（Dopamine, DA）信号通路	20
1.4. 本论文的研究目的和意义	25
第二章 材料与方法.....	26
2.1 材料	26
2.1.1 临床研究对象	26
2.1.2 实验动物	26
2.1.3 实验仪器	26
2.1.4 实验试剂与耗材	28
2.1.5 常用试剂及培养基的配制配置方法	29
2.2 实验方法	32
2.2.1 临床样本的研究方法	32
2.2.2 小鼠形觉剥夺近视（FDM）模型的建立	34
2.2.3 分组	35

2.2.4 给药方法、观察及取材	35
2.2.5 屈光参数测量	35
2.2.6 冰冻切片的制备	37
2.2.7 苏木精-伊红染色 (HE 染色)	37
2.2.8 免疫荧光染色法	38
2.2.9 蛋白印迹 (Western blotting)	39
2.2.10 实时荧光定量-聚合酶链式反应 (Real-time polymerase chain reaction, Real-time PCR) 法测定 C57BL/6J-APC ^{Min} 小鼠巩膜中 I 型胶原和 MMP2, 9 的表达水平	40
第三章 结果	44
3.1 Wnt/β-catenin 信号通路参与小鼠 FDM 近视的发生发展	44
3.1.1 Wnt/ β -catenin 信号通路参与 DA/ D2R 调控 FDM 近视的过程	44
3.1.2 Wnt/ β -catenin 信号通路在 FDM 小鼠近视模型中各时间点的表达情况	47
3.1.3 FDM 处理 28 天小鼠屈光参数的发育	55
3.2 抑制 Wnt/β-catenin 信号通路对小鼠 FDM 近视的影响	57
3.2.1 Niclosamide 抑制 FDM 处理组中 Wnt/ β -catenin 通路的激活	57
3.2.2 Niclosamide 减缓 FDM 处理组中近视的发展	59
3.3 APC^{Min} 小鼠出生后屈光向近视方向发展	61
3.4 抑制 Wnt/β-catenin 信号通路对 APC^{Min} 小鼠近视的影响	65
3.4.1 Niclosamide 抑制 APC ^{Min} 小鼠中 Wnt/ β -catenin 通路的激活	66
3.4.2 Niclosamide 抑制 APC ^{Min} 小鼠近视的发展	66
3.5 高度近视患者的血浆 DKK-1 蛋白水平下调	67
3.5.1 研究对象的一般临床资料	68
3.5.2 高度近视患者与对照组相比血浆 DKK-1 水平的下降	68
第四章 讨 论	70
第五章 总 结	77
第六章 下一步的研究计划	79

参考文献.....	80
附录 英文缩略语对照表.....	95
攻读博士学位期间发表的论文.....	98
致 谢.....	99

厦门大学博士论文摘要库

Catalogue

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Background.....	1
1.1 Classification and epidemiological studies of myopia.....	1
1.2 Animal model of myopia.....	3
1.2.1 Selection of experimental animals.....	3
1.2.2 Myopia induction methods	4
1.3 Mechanism research of myopia	5
1.3.1 Environmental effects on myopia	5
1.3.2 Genetic effects on myopia	6
1.3.3 Studies of signal pathway related to myopia	12
1.3.4 Wnt/ β -catenin signal pathway	15
1.3.5 Dopamine and dopamine receptor 2 signal pathway.....	20
1.4 Research aim, contents and significance.....	25
Chapter2 Materials and methods	26
2.1 Materials	26
2.1.1 Study subjects	26
2.1.2 Experimental animals	26
2.1.3 Major equipments	26
2.1.4 Reagents	28
2.1.5 Major buffers	29
2.2 Methods.....	32
2.2.1 Clinical study design	32
2.2.2 Form deprivation myopia model of mouse	34
2.2.3 Mice was grouped.....	35

2.2.4 Administration approaches, observation and obtain materials	35
2.2.5 Biometric Measurements	36
2.2.6 Frozen section production	37
2.2.7 H&E staining	38
2.2.8 Immunofluorescence	38
2.2.9 Western blot	39
2.2.10 Real-time PCR for mRNA expression	41
Chapter 3 Results	44
3.1 Wnt/ β -catenin signaling Pathway involved in development of FDM myopia	44
3.2 Niclosamide suppressed the development of myopia in the FDM mice	57
3.3 Relative myopia development in the APC ^{Min} mice after birth	61
3.4 Niclosamide suppressed the development of myopia in the APC ^{Min} mice	65
3.5 Decreased plasma DKK-1 levels in myopia patients	67
Chapter 4 Discussion	70
Chapter 5 Conclusion	77
Chapter 6 The plan of next step	79
References	80
Appendix Index of English abbreviations	95
Publications	98
Acknowledgement	99

第一章 前言

近视是一种常见的屈光不正。正常情况下,眼的屈光系统及眼轴长度相互配合,使得来自外界物体的平行光线(一般认为来自 5m 以外)经过眼的屈光系统,聚焦在视网膜的黄斑中心凹上,形成清晰的物像,其要求的精确度达 0.1mm。当眼轴相对较长时,平行光线成像于视网膜之前,形成近视。临床患者表现为能看清近处的物体而看不清远处的物体,往往需要借助凹透镜校正。全世界有超过 5 亿的近视眼患者,单纯性近视给患者的生活带来不便,而高度近视,特别是病理性近视则可能伴随各种严重的并发症,甚至致盲。近视已经成为严重的公共卫生问题,世界卫生组织(WHO)已将近视眼的防治列入全球防盲计划。近视发生和发展的机制研究一直是眼科学研究的重要课题,近视的防治也一直是公众关心的问题。迄今为止,近视发生发展的机制仍未明了,临床上无法获得有效的近视防治方法和手段。因此,研究近视发病的原因,预防近视的形成尤其是防止其发展为高度近视,具有重要的医学和社会价值。

1.1 近视的分类和流行病学研究

近视按屈光成分可分为屈光性近视和轴性近视两类,屈光性近视主要是由于角膜或晶状体的曲率过大,而眼轴长度在正常范围内;轴性近视则主要是由于眼轴长度超出正常范围。近视按程度可分为低度近视(低于-3.00D)、中度近视(-3.00D~-6.00D)和高度近视(高于-6.00D)三类。临床上患者往往兼有屈光性和轴性因素,而高度近视患者以轴性因素为多。正常的眼球长度平均为 24 mm,高度近视者的眼轴平均长达 26 mm。度数高于-8.00D 的高度近视患者往往伴有一系列的眼底病变,故又称为退行性近视(degenerative myopia)或病理性近视(pahtological myopia)¹。

近视在世界上有较高的发生率,尤其以亚洲地区为高。报道其在成年人群中的发病率,在美国约为 33.1%²,在澳大利亚约 15%³,而在亚裔人群中高达 40% 甚至更高(65%-80%)⁴。高度近视的发病率目前尚无准确和专门的统计数字,Sperduto⁵报道近视度数高于-8.00D 者占美国人群的 0.2%-0.4%,而在日本

近视高于-8.00D者约占近视患者的6-8%，占总人群的1%。Wong⁴报道在亚裔近视患者中，近视度数高于-5.00D者占20%，约占总统计人群的7%。Curtini报道美国近视患者中，近视度数高于-6.00D者占27%到32%，约占人群的0.5-2.5%。林⁶大范围调查台湾青少年近视发病率，发现1983年台湾学童7岁，12岁，15岁和18岁近视患病率分别为5.8%，36.7%，64.2%和74%；而2000年分别为21%，61%，81%和84%。此外，高度近视的患病率(>-6D)在18岁的学生们从1983年的10.9%增至2000年的21%。

高度近视可发生很多严重并发症，大部分会致盲，是成人常见的致盲原因之一⁷。其主要的并发症有：1) 后巩膜葡萄肿：发生率为77.1%。主要表现为眼球后极部向后扩张，视神经和黄斑周围视网膜变性萎缩，矫正视力下降。近视度数越高，后巩膜葡萄肿的发生率越高。2) 视网膜萎缩变性、出血和裂孔：由于眼轴变长，后巩膜葡萄肿等因素，高度近视患者容易出现视网膜变性、裂孔，引起出血和视网膜脱离，导致失明。3) 视网膜下新生血管：发生率5%-40%。表现为后极部视网膜下新生血管，引起出血，影响视力。4) 视网膜脱离、白内障、青光眼：由于巩膜扩张和视网膜变性，高度近视患出现视网膜脱离的机会比非高度近视者高7-8倍。高度近视并发白内障和青光眼的机会也比正常人高(如图1.1)。近视在亚洲人群中的高发率及迅速增长率早已引起极大的重视。然而，其具体发病机制不清楚，目前仍然缺乏有效的治疗手段。

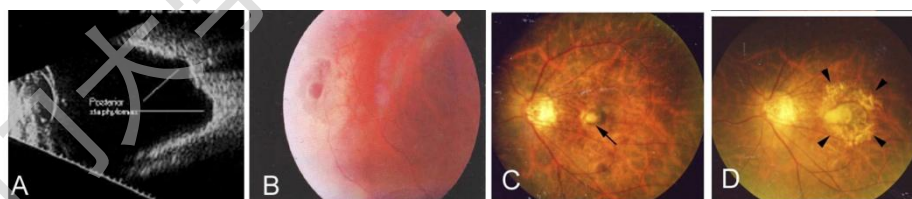


图 1.1 高度近视患者眼底病变

A, 后巩膜葡萄肿; B, 视网膜裂孔; C, 脉络膜新生血管; D, 黄斑萎缩。

Fig 1.1 Characteristic pathological changes in the high myopia patients.

A, posterior scleral staphyloma. B, retinal split holes. C, Choroidal neovascular membrane. D, macular atrophy.

1.2. 近视研究的动物模型

1.2.1 实验动物的选择

20 世纪 70 年代, Wallman 首先建立了小鸡的近视动物模型⁸。现在, 近视动物模型已经成为近视研究的有力工具, 人们从近视动物模型上获得了许多有意义的结果, 使近视的研究取得了很大的进步。

近年来已建立的近视动物模型主要有鸡、豚鼠、恒河猴、短尾猴、狨猴、豚鼠和小鼠等动物 (如图 1.2)^{9, 10, 11}。小鸡是最早建立的近视动物模型。鸡出生时为远视, 完成正视化需要 6-7 周, 玻璃体腔在整个正视化过程中起主要作用¹²。最近研究发现, 小鸡在眼球结构和调节机制等方面与人类有很大的差异, 因此采用鸡眼获得的结果和人类相差较大。哺乳类实验动物眼球与人类较接近, 其研究结果较接近临床, 比较有价值。豚鼠在开眼后给予诱导, 一般在 10 周左右可获得 10.00 D 左右的近视。豚鼠的眼球结构和人类相似, 在近视发生发展过程中, 其巩膜组织的细胞外基质发生降解。但豚鼠也有很多缺点, 如正视化研究发现, 豚鼠眼球在开眼前后存在两个生长高峰, 这 and 人类有区别; 豚鼠分布较少, 并不是生物学和医学研究常用的模式动物, 较难获得; 豚鼠的全基因序列等基础数据缺乏, 因此在应用上存在一定的局限性。猴是近视研究的动物模型之一, 常用的是狨猴和恒河猴。猴在出生后给予形觉剥夺, 一般需要较长的时间方可获得 2-5D 左右的近视; 猴的眼球结构和人类相似, 在近视发生发展过程中, 巩膜组织的细胞外基质发生降解; 猴作为灵长类动物, 从进化角度来看最接近于人, 但猴成本高, 饲养要求高, 时间长, 动物形体较大, 配合性差, 形觉剥夺等诱导因素常难以维护, 如需要订制特别的头套并在头套上加镜

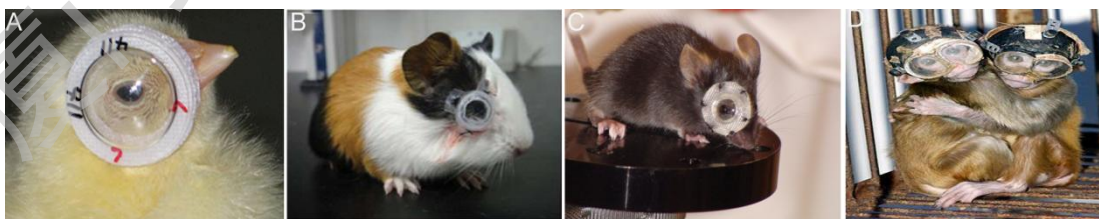


图 1.2 研究近视的主要动物模型。

小鸡; B, 豚鼠; C, 小鼠; D, 恒河猴。

Fig.1.2 Animal model of myopia.

A, chick. B, guinea pig. C, mouse. D, rhesus monkey.

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.